

薄層クロマトグラフィーによる精薄児 尿中遊離アミノ酸分析

平 野 久 美 子

On the Free Amino Acids in the Urine of Mentally Retarded Children by Thin Layer Chromatography

BY KUMIKO HIRANO

は じ め に

薄層クロマトグラフィーは、1959年 Stahl¹⁾²⁾ によって、標準操作法が示されて以来、急速に普及し、広く用いられるようになった。本法はアミノ酸検出法として従来広く用いられていたペーパークロマトグラフィーやカラムクロマトグラフィーに比して、短時間に検出、同定できる利点をもち、又分離度も高いものである。他方、精神薄弱児には、Phenylketonuria³⁾ Maple syrup urine disease⁴⁾ Arginosuccinic aciduria⁵⁾⁶⁾ Citrullinuria⁷⁾, Hartnap disease⁸⁾ 等アミノ酸代謝障害を示すものが知られているが、現在、更にいろいろの症状をもつ患者について、アミノ酸代謝異常の有無の検討がなされている。それで、私は、病理不明の精神薄弱児の病態を、アミノ酸代謝の面から、解明するための手掛りの一つとして、薄層クロマトグラフィーを用いて、精神薄弱児の尿中遊離アミノ酸分析を試みた。

実 験 方 法

(I) 実験対象

第1表 対 象 児 童

堺市立養護学校分校
に通学している学童、
6才から15才までの
156名を対象として、
早朝空腹時尿を採り、
遊離アミノ酸の排泄像

性別	年令											計
	6才	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
男 子	3	4	4	8	3	10	14	12	14	12	84	
女 子	1	3	1	9	6	3	9	7	10	23	72	
計	4	7	5	17	9	13	23	19	24	35	156名	

を検索した。第1表に対象児童の年令、性別分類を示した。

(II) 装置及び試薬

- 1) 装置 ; Stahl の装置 (デサガ社製) による。
- 2) プレートの作製

a) 洗剤でよく脱脂水洗乾燥したガラス板 (20×20cm) 5枚に, b) Silicagel (WakogelB-5) 20gを乳鉢にとり, 蒸留水40mlを加えてよく練り, 蒸留水15mlを追加して均一なペーストとした後はげしく攪拌し, アプリケーターに注入し, c) アプリケーターを一様の速度で移動させて薄層を作る。d) 薄層を塗布したプレートを15分間放置して吸着層が固化した後プレート架台上で, 一夜風乾して使用する。

3) 展開溶媒及び展開条件

一次元溶媒として, 石炭酸・水 (75:25), 二次元溶媒として, n-ブタノール・醋酸・水, (60:20:20) を用いた。展開槽に溶媒を深さ0.5cm迄 (100ml) 加え, 展開時温度は25~30℃とし, 上昇法によって展開させた。展開距離は14cm (2~3時間) とした。

4) 発色

0.2%ニンヒドリンブタノール液を噴霧し, 100℃, 10分間加熱発色させた。

5) 同定

上述の溶媒を用いて, 既知の各種アミノ酸について, 数回にわたり展開して得た Rf 値を基準にして判定した。

(Ⅲ) 試料の調製

尿処理; 尿10mlを蒸発皿にとり, 上から送風しながら, 沸騰水浴上で蒸発濃縮し, 次にこれに冷却したメタノール・アセトン (3:

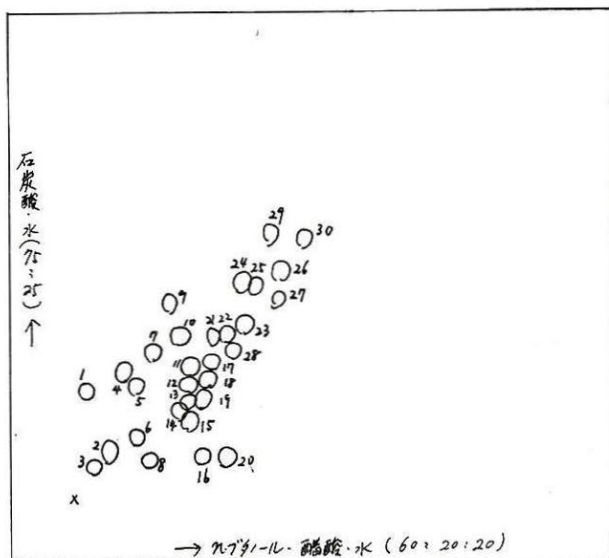
1) の混合液 6mlを加え, 析出する塩類を遠心沈澱して除去し, 次に, その上清を前同様沸騰水浴上で濃縮乾固し, 蒸留水 0.5 mlを加えて, これを試料とした。

試料の塗布; プレートの両端より 2cmはなれたところに濃縮尿一滴をスポットした。

実験成績

1) 各種アミノ酸の Rf 及び二次元薄層クロマトグラム

純アミノ酸の 0.1%水溶液を試料とし, 二種の溶媒を用いて測定した Rf値は, 第2表に示す如くである。Brenner⁹⁾ の値と多少の相違が認められるが, Rfの配列順序は概ね一致している。又第1図に各種アミノ酸



1 Methylmethionine, 2 Lysine, 3 Ornithine, 4 Histidine, 5 Arginine, 6 Cystine, 7 Methylcysteine, 8 Cysteic acid, 9 Proline, 10 Hydroxy proline, 11 Glutamin, 12 Asparagin, 13 Glycine, 14 Taurine, 15 Serine, 16 Aspartic acid, 17 β -Alanine, 19 Threonine, 20 Glutamic acid, 21 γ -Aminobutyric acid, 22 β -Amino iso butyric acid, 23 Valine, 24 Methionine, 25 Isoleucine, 26 Leucine, 27 Tyrosine, 28 Cysteine, 29 Phenylalanine, 30 Tryptophan

第1図 既知アミノ酸の薄層クロマトグラム

第2表 既知アミノ酸のRf (100)

アミノ酸	溶 媒	石炭酸・水(75:25)		n-ブタノール・醋酸・水 (60:20:20)	
	研究者	本実験	Brenner ⁹⁾	本 実 験	Brenner ⁹⁾
Histidine		25	32	10	6
Lysine		10	9	8	5
Arginine		24	19	11	8
Glutamic acid		8	10	30	27
Aspartic acid		8	6	28	21
Serine		16	20	25	22
Glycine		20	24	25	22
Threonine		20	26	29	25
Alanine		24	29	29	27
Valine		37	40	38	35
Leucine		49	48	40	47
Isoleucine		46	49	33	46
Methionine		46	49	30	40
Tyrosine		42	47	40	47
Phenylalanine		56	55	38	49
Tryptophan		55	63	43	56
Cystine		8	12	14	16
Cysteine		29	—	30	—
Proline		40	50	20	19
Hydroxyproline		33	38	21	20
<i>r</i> -Amino-butyric acid		32	—	30	—
Ornithine		6	—	4	—
Cysteic acid		7	—	16	—
β -Alanine		27	30	27	27
Glutamine		27	—	24	—
Taurine		17	—	21	—
Methylcysteine		29	—	16	—
Methylmethionine		23	—	2	—
Asparagin		23	—	23	—
Sarcosin		—	37	—	17
β -Amino iso butyric-acid		32	—	34	—

の二次元薄層クロマトグラムを示した。

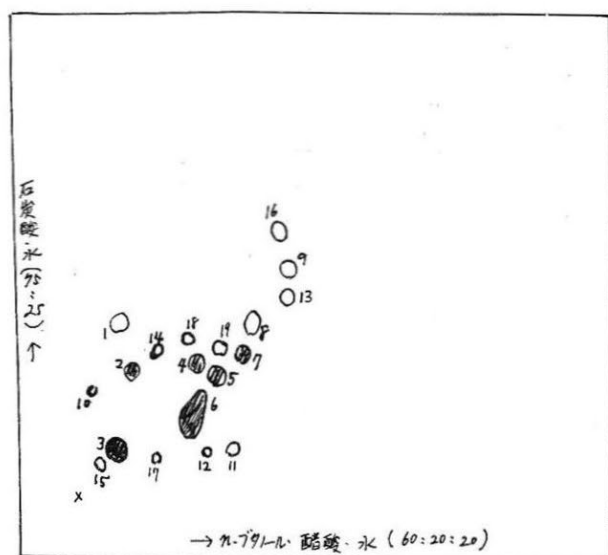
2) 精薄尿の尿中遊離アミノ酸の薄層クロマトグラフィー

第2図に示した如く、総数19個のニンヒドリン陽性スポットを得た。このうちスポット NO. 1 と NO. 10, NO. 14, NO. 19 は同定することができなかった。又スポット NO. 6は Taurine, Serine, Glycine, Threonine が相当したが、これらのアミノ酸を相互に分離することができなかった。

第3表、第3図に尿中遊離アミノ酸の出現数を示した。少い例で3個、多い例で12個のスポットを認めた。5から7個のスポットを認めたものがほとんどで、全体の75%であった。

次にいかなるアミノ酸がいかなる頻度で検出されるかを検討した結果は、第4表、第4図に示す如

くで, Histidine, Lysine, Alanine, Glutamine, β -Amino iso butyric acid, スポット NO.6 (Taurine, Serine, Glycine, Threonine)が, 半数以上の例に検出された。次にスポット NO.1と NO.19, Leucineがやゝ多く, その検出率は, それぞれ36.6%, 19.3%, 12%であった。Aspartic



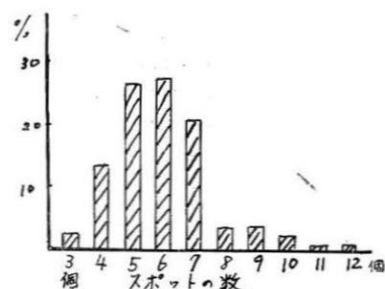
1 —, 2 Histidine, 3 Lysine, 4 Glutamine, 5 Alanine, 6 Taurine, Serine, Glycine, Threonine, 7 β -Amino iso-butyrac acid, 8 Valine, 9 Leucine, 10 —, 11 Glutamic acid, 12 Aspartic acid, 13 Tyrosine, 14 —, 15 Ornithine, 16 Phenylalanine, 17 Cysteic acid, 18 Hydroxy proline, 19 —

註 ●は検出率50%以上のスポット

第2図 尿の薄層クロマトグラムに現われたニンヒドリン陽性スポット

第3表 尿中遊離アミノ酸の出現数

検出数	性別		男		女		計	
	人数	%	人数	%	人数	%	人数	%
3個	3人	3.6%	1	1.4	4	1.6		
4	11	13.1	10	13.9	21	13.5		
5	21	25.0	21	29.2	42	26.9		
6	28	33.4	15	20.8	43	27.5		
7	21	25.0	12	15.7	33	21.2		
8	4	4.7	6	9.3	10	6.4		
9	3	3.6	3	4.2	6	3.8		
10	2	2.4	2	2.8	4	2.5		
11	1	1.2	1	1.4	2	1.3		
12	—	—	1	1.4	1	1.4		



第3図 尿中遊離アミノ酸出現数 (%)

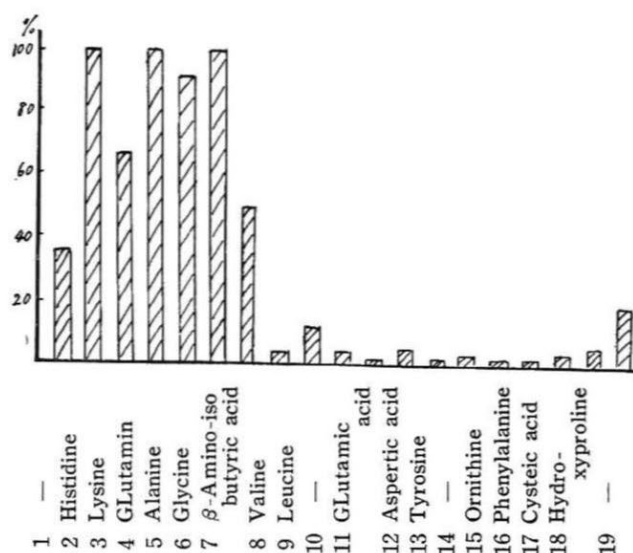
acid, Glutamic acid, Tyrosine, Phenylalanine, Valine, Ornithine Hydroxyproline が5%以下に検出された。Arginine, Tryptophan, Proline, Methionine, Cysteine などはいずれの例にも検出されなかった。健康な成人, 三人について分析した結果もほぼ同様で, 5~7個のスポットを認め, その種類も, 今回の研究対象となった精神薄弱児の尿中遊離アミノ酸中その検出率の高いものと一致した。

考 察

ペーパークロマトグラフィーや, カラムクロマトグラフィーを用いて尿中遊離アミノ酸の種類並びにその量について検索した報告¹⁰⁾⁻¹⁸⁾は少ないが, その成績はかなりまちまちであって比較検討することは必ずしも容易ではない。しかし, Glycine, Alanineが最もしばしば検出されることは殆んどの報告に共通

第4表 尿中遊離アミノ酸検出率(%)

スポット 番 号	ア ミ ノ 酸	男		女		計	
		人 数	%	人 数	%	人 数	%
1	—	27	32.1	30	41.6	57	36.6
2	Histidine	84	10.0	72	100	156	100
3	Lysine	46	54.7	59	82	105	67.2
4	Glutamin	84	100	72	100	156	100
5	Alanine	79	98.0	64	89.0	143	91.5
6	Taurine, Serine Glycine, Threonine	84	100	72	100	156	100
7	β -Amino iso butyric acid	39	46.4	39	54.1	78	50
8	Valine	4	4.8	3	4.2	7	4.5
9	Leucine	12	14.3	8	11.1	20	12.8
10	—	2	2.4	5	6.9	7	4.5
11	Glutamic acid	1	1.2	2	2.8	3	1.9
12	Asparac acid	4	4.8	4	5.5	8	5.1
13	Tyrosine	1	1.2	0	0	1	0.6
14	—	1	1.2	3	4.2	4	2.6
15	Ornithine	1	1.2	1	1.4	2	1.3
16	Phenylalanine	1	1.2	1	1.4	2	1.3
17	Cysteic acid	3	3.6	0	0	3	1.9
18	Hydroxy proline	3	3.6	5	6.9	8	5.1
19	—	21	25.6	9	12.5	30	19.3



第4図 精薄尿尿中アミノ酸検出率(%)

した所見であり、本実験の成績でも同様な結果が得られた。Histidineもしばしば見出されるアミノ酸の一つとされており本実験においても高い検出率を示した。Lysine に関しては、大部分の報告はかなり低い検出率を示しているが、本実験では比較的高率に検出された。Glutamin については、かなり低い検出率しか示さなかったという報告もあるが、二三の報告¹⁵⁾¹⁾では主なアミノ酸の一つに数えており、本実験に於ては、全例に検出された。 β -Amino iso-butyrac acid は1951年 Crumber¹⁸⁾

等により発見されたもので人間の尿から最初に分離された非蛋白性アミノ酸である。寺尾¹³⁾大橋¹⁴⁾

Berry¹⁵⁾ Bickel¹⁹⁾ 中村²⁰⁾ 等が尿中にこれを証明している。本実験でもかなりの頻度で証明された。このアミノ酸を大量に排泄する者は、欧米の報告では健康人の4.5¹⁹⁾～10¹¹⁾%にみられるといわれるが、東洋人ではその排泄頻度が高く、寺尾¹³⁾は45%に及んだと報告している。このアミノ酸を大量に排泄する形質は、遺伝性を有すること、又白血病の患者や放射線照射後その排泄が増加すること又新生児あるいは貧血や成長遅滞の子供にも尿中にこのアミノ酸が多いことなどが報告²¹⁾されている。Asparatic acid, Tyrosine, Leucine, Valine などは以上のべたアミノ酸の次に、しばしば検出されるアミノ酸とされているが、その検出率は高くなく、本実験の成績とほぼ一致している。一方、Glutamic acidはペーパークロマトグラフィーでは比較的高率に検出されるアミノ酸とされているが、本実験では、ごくわずかの例にしか証明されなかった。既に述べたアミノ酸以外に α -Amino-n-butyric acid α -Amino adipic acid, Citrulline, 1-及び3-Methyl-histidine 等を証明した報告¹²⁾があり、本実験における末同定スポットの NO. 1, NO. 10, NO. 14, NO. 19 が、これらに相当するかもしれないと考えたが、試薬を入手することができなかったため、今回はこれらを追求し得なかった。

以上の如く、従来のペーパークロマトグラフィーやカラムクロマトグラフィーを用いて測定した報告と比較して、大部分のアミノ酸の検出率については、同様な結果が得られた。ただ本実験では、Lysine, Glutamin の検出率が高く Glutamic acid の検出率が低かった。Taurine, Serine, Glycine Threonine の分離がわるいこと、二三のスポットの末同定等問題を残してはいるが、薄層クロマトグラフィーはペーパークロマトグラフィーに較べ分離ならびに感度がよく、従来証明されなかったスポットが二三認められたことや、二次元展開に要する時間が4～5時間である点において、長所があると思われ、又カラムクロマトグラフィーと比較しても、その設備並びに操作が簡単で、実験に要する時間も少くてすむという点においてすぐれ、今後アミノ酸尿を有する症例を Screening する方法として、一層利用されることと思われる。

要 約

薄層クロマトグラフィーを用いて、精薄児 156 名の尿中遊離アミノ酸排泄像を検索し、次の結果を得た。

1) ニンヒドリン陽性スポットの出現数は少い例で3個、多い例で12個総数19個を得た。陽性スポット5～7個を示したものが殆んどで全体の75%に達した。

2) このうち高率に検出されたアミノ酸は、Alanine, Glutamin, Histidine, Lysine, β -Amino iso butyric acid, とスポット NO. 6 (Taurine, Serine, Glycine, Threonine) 並びに末同定スポット NO. 1 でこれに対して、Asparatic acid, Tyrosine, Leucine, Phenylalanine, Glutamic acidなどの検出率は低かった。Arginine, Proline, Methionine, Tryptophan, Cysteine 等はいずれの例にも見出されなかった。

3) アミノ酸の尿中排泄については、本実験の成績はペーパークロマトグラフィーやカラムクロマトグラフィーによるこれまでの報告と比較して、Lysine, Glutamin の検出率が高く、Glutmic acid

の検出率が低かった以外は、ほぼ同様な結果が得られた。

本論文の要旨は第15回電気泳動学会総会において発表した。

稿を終るに臨み、直接ご指導、ご校閲を賜った山本勝朗教授に深甚なる謝意を表します。また精薄児の採尿に際し、ご協力をいただいた堺市立養護学校教諭、岡田宮子先生に謝意を表します。

文 献

- (1) E. Stahl : Chemiker ztg. **82**, 323 (1958)
- (2) E. Stahl : Pharmazeutische Rurdschau **1** (1957) Special edition, No.2
- (3) S. W. Wright and G. Tarjan : A. M. A. J. Dis. Child., **93**, (1957)
- (4) R. G. Westall, J. Dancis and S. Mijler : A. M. A. J. Dis. Child., **94**, 571 (1957)
- (5) J. D. Allan, D. C. Cusworth and V. K. Wilson : Lancet, No. **7013**, 182 (1958)
- (6) R. G. Westall : Biochem. J., **77**, 135 (1950)
- (7) W. C. McMurray, F. Mohyuddin, R. J. Rossiter, J. C. Rathbun, G. H. Valentine, S. J. Koegler and D. E. Zart : Lancet No. **7221**, 138 (1962)
- (8) M. D. Milne, M. A. Crawford, C. B. Girao, L. Lough-ridge : Biochem. J. **72**, 309 (1959)
- (9) M. Brenner, A. Niederwieser : Experientia **16**, 378, (1960)
- (10) W. H. Stein : I. Biol. Chem. **201**, 45 (1953)
- (11) D. F. Everd : Biochem. J. **62**, 416 (1956)
- (12) I. F. Dorothy, M. N. Patricia, W. Cheung and L. P. Edward : Arch. Biochem. Biophys. **68**, 452 (1957)
- (3) 寺尾寿夫：精神神経学雑誌 **62**, 2061 (1960)
- (14) 大橋貞子：日本小児科学会雑誌 **63**, 540 (1959)
- (15) H. K. Berrg : Pediatrics **25**, 983 (1960)
- (16) H. Ghadimi and H. Shwachman : Am. J. Dis. Child. **1**, **79**, 457 (1960)
- (17) 車田孝夫：日本小児科学会雑誌 **67**, 686 (1963)
- (18) H. R. Crumpler, C. E. Dent, H. Harris and R. G. Westall : Nature, Lond. **167** (4243), 307 (1951)
- (19) H. Bickel, et al : Arch. Kinderheilk, **31** (1955)
- (20) 中村六之介：生化学 **29**, 242 (1957)
- (21) H. K. Berry : Metabolism, Clin and Exptl. **9**, 373 (1960)

Summary

The free amino acids in urine were determined by thin layer chromatography on 156 mentally retarded children. The results were as follows;

- 1) Nineteen ninhydrin positive substances were detected in all the cases; 5 to 7 substances each in most samples, a minimum number of 3 and a maximum of 12 substances in a few samples.
- 2) The following substances were found in more than 50% of all the cases examined;

Alanine, Glutamin, Histidine, Lysine, β -Amino iso butyric acid and spot NO.6 (Taurine, Threonine, Glycine, Serine), On the other hand, Asparatic acid, Tyrosine, Leucine, Valine, Phenylalanine and Glutamic acid were found only in 5% of the total number of cases.

3) The present results obtained by thin layer chromatography were identical with those reported by other workers who used column or paper chromatography, except the author detected Lysine and Glutamin in a higher percentage and Glutamic acid in a lower percentage than those reported by other workers.